

王海鸽,林志健,张冰,等. 高蛋白高钙饮食合并限制饮水建立鹌鹑痛风模型初探[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 15 - 22.

Wang HG, Lin ZJ, Zhang B, et al. Preliminary study on the establishment of a quail model of gout induced by high-protein and high-calcium diet combined with restricted drinking water [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 15 - 22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.003

# 高蛋白高钙饮食合并限制饮水建立鹌鹑痛风模型初探

王海鸽,林志健,张冰\*,李高玺,王笑

(北京中医药大学中药学院,北京 100029)

**【摘要】** 目的 通过模拟临床高蛋白高钙饮食诱导迪法克鹌鹑痛风,初步探讨建立鹌鹑痛风模型的方法,为痛风发病机制研究及防治药物筛选提供依据。方法 选用36只30日龄雄性健康迪法克鹌鹑,以体重和血尿酸水平随机分为3组,即对照组、模型I组和模型II组,每组12只。对照组鹌鹑饲喂基础日粮,模型组饲喂高蛋白高钙日粮(日粮粗蛋白含量29.5%,钙含量7.8%),对照组、模型I组自由饮水,模型II组每日限制饮水4h,实验持续50d。检测鹌鹑血清、粪尿酸水平,同时检测肾功能并进行组织学病理切片观察。结果 高蛋白高钙日粮可使鹌鹑血清尿酸水平显著升高;粪尿酸水平显著降低;血清肌酐、尿素氮水平升高;导致鹌鹑肾尿酸盐沉积明显。高蛋白高钙日粮合并限制饮水可加剧血尿酸水平升高、肾尿酸盐沉积,使部分鹌鹑出现关节肿大、变形等痛风症状。结论 饲喂高蛋白高钙日粮并限制饮水量可以建立痛风鹌鹑模型,其发病过程与临床痛风病因、发病机制及临床表现更为符合,为痛风病的基础及药物开发研究提供参考。

**【关键词】** 鹌鹑;痛风;高蛋白高钙饮食;尿酸盐沉积;高尿酸血症

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)04-0015-08

## Preliminary study on the establishment of a quail model of gout induced by high-protein and high-calcium diet combined with restricted drinking water

WANG Haige, LIN Zhijian, ZHANG Bing\*, LI Gaoxi, WANG Xiao

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a quail model of gout by simulating a clinical high-protein and high-calcium diet, and to provide a basis for studying gout pathogenesis and drug screening for its prevention and treatment. **Methods** Thirty-six 30-day-old healthy male quails were randomly and equally divided into three groups according to body weight and blood uric acid level, namely, the control group, model I group, and model II group. The control group was fed the basal diet, and the model groups were fed a high-protein high-calcium diet (dietary crude protein content of 29.5% and calcium content of 7.8%). The control group and the model I group were provided with drinking water ad libitum, while the model II group was given drinking water restricted to 4 h daily. The experiment lasted for 50 days. The serum and fecal uric acid levels were measured, renal function was determined, and histopathological examination was performed. **Results** The high-protein and high-calcium diet significantly increased serum uric acid levels, significantly reduced fecal uric acid

[基金项目] 国家重大新药创制(2017ZX09301024);国家自然科学基金(81673618);北京市自然科学基金(7162117)。

[作者简介] 王海鸽(1993—),女,硕士研究生,研究方向:中药防治代谢性疾病。E-mail: wanghaige03@163.com

[通信作者] 张冰(1959—),女,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中药防治代谢性疾病、中药药物警戒与合理用药研究。E-mail: zhangbing6@263.net

levels, and did not change the serum creatinine and urea nitrogen levels. The high-protein and high-calcium diet combined with restricted drinking water aggravated the increase of blood uric acid level and renal urate deposition, causing gout changes such as joint swelling and deformation. **Conclusions** A gout model can be established by feeding on a high-protein and high-calcium diet and limiting the amount of drinking water. The pathogenesis of gout in this model is more consistent with the etiology, pathogenesis, and clinical manifestations of gout in clinics, providing a reference for the research on gout pathogenesis and drug development.

**【Keywords】** quail; gout; high-protein and high-calcium diet; urate deposition; hyperuricemia

人类在进化过程中发生了基因突变,缺乏尿酸氧化酶,以尿酸为嘌呤代谢终产物,使得人类血尿酸水平远高于其他哺乳动物,从而易患高尿酸血症及痛风<sup>[1]</sup>。而禽类肝不含精氨酸酶和氨甲酰磷酸合成酶,摄入的蛋白质最终以尿酸的形式自肾排出,与人类尿酸代谢更加接近。禽痛风是一种发病率较高的禽类常见疾病<sup>[2-3]</sup>,国内外多有报道,高蛋白、高钙的营养性因素可引发禽类痛风,导致禽类出现关节肿胀、运动障碍、内脏尿酸盐沉积甚或大批量死亡等<sup>[4-6]</sup>。实验常用的啮齿类动物等具有尿酸酶,可将尿酸降解成尿酸素排出体外,尿酸酶缺失鼠造价昂贵。常用的实验模型仅能模拟关节痛风症状<sup>[7]</sup>,与人类痛风发病机理不相一致。以禽类作为痛风模型动物,建立模拟临床饮食诱导的鹌鹑痛风模型,从尿酸代谢途径的相似性、操作的简便性、经济性等方面均具有优势。

本实验模拟临床发病病因,以酵母、骨粉作为高蛋白、高钙日粮添加剂饲喂迪法克鹌鹑,并对比自由饮水和限制饮水,探讨高蛋白高钙日粮及饮水量对鹌鹑尿酸代谢及痛风发生的影响,以期建立稳定持久、操作简便、适合大批量实验的痛风模型,为痛风的基础及药物开发研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

普通级雄性迪法克鹌鹑 36 只,30 日龄,体重(150±10)g,均购自北京市德岭鹌鹑养殖场[SCXK(京)110113600218082]。鹌鹑购入后,饲养于北京中医药大学普通级动物实验室[SYXF(京)2016-0038]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。伦理审查证号:110000013479。饲养环境:室温 20℃~25℃,相对湿度 40%~60%,光照 12 h 明,12 h 暗。

### 1.2 主要试剂与仪器

造模添加剂:酵母浸膏粉(批号:1349145-02;500 g),购自北京化学试剂公司;骨粉(批号:

20180301;500 g),购自衡水爱宠商贸有限公司。

检测试剂盒:尿酸测定试剂盒(批号:181361;100T;生产时间:20180109),购自中生北生生物科技股份有限公司;尿素氮测定试剂盒(批号:20180408;96T;生产时间:20180408)、肌酐测定试剂盒(批号:20171124;96T;生产时间:20171124),均购自南京建成生物工程研究所;尿酸盐染色试剂盒(批号:20180604;4×50 mL;生产时间:20180604),购自北京索莱宝科技有限公司。

SHZ88-1 型台式水浴恒温振荡器,北京医疗设备厂;3K1S 低温高速离心机,德国 Sigma 公司;sunrise 酶标仪,瑞士 TECAN 公司;DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱,北京鸿达天矩试验设备有限公司;Reichert Histo STAT 石蜡组织切片机,美国 AO 公司;Olympus BX53 显微镜,日本奥林巴斯;Himadzu B1-220H 电子天平,日本岛津公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 造模方法

对实验鹌鹑按鹌鹑免疫程序进行免疫,选取 36 只经常规免疫接种的雄性 30 日龄、体重相近、血尿酸水平相近的迪法克鹌鹑开展实验研究(购自北京种禽公司德岭鹌鹑场)。随机分为 3 组,每组 12 只,即对照组、模型 I 组、模型 II 组。

对照组鹌鹑饲喂基础日粮(日粮粗蛋白含量 21.7%,钙含量 1%),模型 I 组和模型 II 组饲喂高蛋白高钙日粮(日粮粗蛋白含量 29.5%,钙含量 7.8%),对照组和模型 I 组鹌鹑自由饮水,模型 II 组鹌鹑每日限制饮水 4 h。日粮除嘌呤和钙水平之外,其余营养成分均符合美国 NRC 家禽营养需要标准<sup>[8]</sup>。日粮组成和主要营养成分见表 1。实验鹌鹑笼养,每日定时喂饲料,并清洁鹌鹑舍。每 10 d 称取一次鹌鹑体质量,并于晚 8 点禁食,于次日早 8 点颈静脉取血一次,检测血清生化指标。每 20 d 给鹌鹑放入代谢笼,收取 24 h 鹌鹑粪尿混合物,检测粪尿上清液生化指标。实验第 50 天,鹌鹑颈静脉取血 1.5 mL 后处死,取各组鹌鹑肾脏组织固定、石蜡包

埋。控制动物房室温 20℃~25℃,湿度 40%~60%。光照 12 h 明,12 h 暗。

表 1 造模剂配比及营养水平(风干基础,%)

Table 1 Composition and nutrient levels of the model diets (air-dry basis, %)

项目 Items	对照组 Control group	模型 I/II 组 Model groups I/II
原料 Ingredients	55	26
玉米 Corns	33	15.6
豆粕 Soybean meal	2	1
鱼粉 Fish meal	5	2.4
骨粉 Bone meal	-	30
酵母粉 Yeast extract	-	20
预混料 Premix	5	5
合计 Total		
营养水平 Nutrient levels		
粗蛋白 CP	21.7	29.5
钙 Ca	1	7.8
有效磷 AP	0.5	3.73

注:预混料为每千克饲料提供:维生素 A 200000 IU,维生素 D3 60000 IU,维生素 E 380 mg,维生素 K3 56 mg,维生素 B1 56 mg,维生素 B2 200 mg,维生素 B6 60 mg,维生素 B12 300 μg,生物素 3 mg,烟酸 600 mg,泛酸钙 240 mg,叶酸 30 mg,铜 0.2 g,铁 1.8 g,锰 1.4 g,锌 1.1 g,硒 6 mg,碘 8.5 g,磷 15~60 g,钙 100~250 g,氯化钠 50~150 g,氨基酸 28 g。

Note. The premix provides the following nutrients per kg diets: VA 200000 IU, VD3 60000 IU, VE 380 mg, VK3 56 mg, VB1 56 mg, VB2 200 mg, VB6 60 mg, VB12 300 μg, biotin 3 mg, niacin 600 mg, pantothenic acid 240 mg, folic acid 30 mg, Cu 0.2 g, Fe 1.8 g, Mn 1.4 g, Zn 1.1 g, Se 6 mg, I 8.5 mg, P 15~60 g, Ca 100~250 g, NaCl 50~150 g, amino acids 28 g.

### 1.3.2 一般状态观察

实验期间每天定时称量耗料量;每 10 d 称重一次,每次称重时间保持一致;每 10 d 测量一次动物踝关节周径,用软线环绕鹤鹑踝关节三周,连续测量 3 次,保证每次测量时间及位置一致,以测量区软线长度平均值的 1/3 作为鹤鹑踝关节周径。踝关节肿胀度(%)=(测量日踝关节周径-实验前踝关节周径)/实验前踝关节周径×100%。计算各组鹤鹑平均采食量、体重和关节肿胀度。实验期间每日观察鹤鹑的精神状态、食欲、粪便情况、运动状态等。

### 1.3.3 肾病理变化及尿酸盐沉积

实验持续 30 d 结束,对动物禁食不禁水 12 h 后,空腹采血 2 mL,处死动物,取动物肾样本,进行固定、包埋、切片、HE 染色、尿酸盐染色。观察动物肾病理形态及尿酸盐沉积状况。

### 1.3.4 血清生化指标

实验开始前采集鹤鹑血液,检测血清尿酸水平,记录鹤鹑初始尿酸水平。实验期间,以 10 d 作

为一个周期动态观测鹤鹑血清尿酸、肌酐、尿素氮水平。即每 10 d 对动物禁食不进水 12 h 后,空腹颈静脉采血 1.0 mL,静置 3 h 后,4℃ 3500 r/min 离心 10 min,分离血清。在半自动生化仪上,以酶比色法测定鹤鹑血清尿酸、尿素氮、肌酐水平。

### 1.3.5 粪尿生化指标

实验第 20 天对鹤鹑进行一次代谢收集,收集其粪尿混合物,充分震荡,4℃ 3500 r/min 离心 10 min,分离上清液。在半自动生化仪上,以酶比色法测定鹤鹑血清尿酸水平。

## 1.4 统计学方法:

实验数据采用 SPSS 19.0 统计学软件进行方差分析。各组实验数据均以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  表示差异有显著性,以  $P<0.01$  表示有极显著性差异。

## 2 结果:

### 2.1 造模期间鹤鹑痛风症状

由表 2、表 3、表 4、图 1 可知,实验期间对照组鹤鹑体重、日均采食量平稳上涨;踝关节未见明显肿胀;毛色鲜亮、有光泽;鸣叫声嘹亮;活泼好动,其精神状态、行为状态良好。模型 I 组鹤鹑体重较对照组高,一般状态良好,与对照组相较无显著性差异。模型 II 组鹤鹑鹤鹑体重、日均采食量平稳上涨;可见踝关节明显肿胀,实验第 10 天,显著性高于对照组( $P<0.05$ ),实验第 20~50 天踝关节肿胀度极显著性高于对照组( $P<0.01$ );毛色鲜亮、有光泽;鸣叫声嘶哑;部分鹤鹑出现懒动喜卧、跛足、足趾变形等症状。

### 2.2 造模后鹤鹑肾病理变化及尿酸盐沉积状况:

鹤鹑肾脏病理切片 HE 染色 400 倍光学显微镜下可见对照组鹤鹑肾组织结构清晰,细胞核蓝染,细胞浆均匀红染,肾小球、肾小管结构正常。模型 I 组鹤鹑肾组织结构未见明显异常,组织结构清晰,肾小管上皮细胞形态正常。模型 II 组鹤鹑肾组织结构清晰,细胞浆疏松、不均匀红染,部分肾小球萎缩,肾小管管腔扩张。见图 2。

鹤鹑肾尿酸盐染色 400 倍光学显微镜下可见,对照组鹤鹑肾组织未见黑色尿酸盐结晶。模型 I 组鹤鹑肾组织明显可见黑色的尿酸盐结晶沉积于肾小管周围。模型 II 组鹤鹑肾组织显著可见大量黑色尿酸盐结晶沉积于肾小管周围。见图 3。

### 2.3 造模期间鹌鹑尿酸水平

由表 5、表 6 可见,实验期间,与对照组相比,模型 I 组鹌鹑于实验第 20 d 血清尿酸水平显著性高于对照组 ( $P < 0.05$ ),实验第 30~50 天血清尿酸水平均极显著性高于对照组 ( $P < 0.01$ );模型 II 组鹌鹑于实验第 10~50 天血清尿酸水平均极显著性高于对照组 ( $P < 0.01$ )。其余各组血清尿酸水平与对照

组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

实验期间,与对照组相比,模型 I 组鹌鹑于实验第 20 天粪尿酸水平显著性低于对照组 ( $P < 0.05$ );模型 II 组鹌鹑于实验第 40 天粪尿酸水平显著性低于对照组 ( $P < 0.05$ ),实验第 20 天粪尿酸水平极显著性低于对照组 ( $P < 0.01$ )。

表 2 高蛋白高钙日粮对鹌鹑体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, g, n = 12$ )

Table 2 Effects of high-protein and high-calcium diet on body weight of the quails

组别 Groups	0 天 0 d	10 天 10 d	20 天 20 d	30 天 30 d	40 天 40 d	50 天 50 d
对照组 Control group	147.66±6.06	153.06±8.88	158.19±7.8	159.53±6.03	162.94±5.95	163.06±11.22
模型 I 组 Model group I	144.98±9.89	146.63±10.35	148.98±11.98	146.25±15.24	152.94±20.1	164.22±11.87
模型 II 组 Model group II	146.13±16.66	149.78±14.27	149.28±23.84	159.95±14.03	162.72±16.31	163.19±14.87

表 3 高蛋白高钙日粮对鹌鹑采食量的影响 ( $\bar{x} \pm s, g, n = 12$ )

Table 3 Effects of high-protein and high-calcium diet on feed intake of the quails

组别 Groups	10 天 10 d	20 天 20 d	30 天 30 d	40 天 40 d	50 天 50 d
对照组 Control group	24.5±5.15	24.8±3.86	27.9±2.84	27.8±2.12	29.5±1.96
模型 I 组 Model group I	30.9±5.75**	31.6±5.42*	36.2±1.7**	35.6±3.19**	35.7±1.96**
模型 II 组 Model group II	22.8±5	26.1±1.91	32.8±4.03**	33.8±2.8**	33.5±5.08

注:与同期对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。下表同。

Note: Compared with the control group at the same day, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .The same in the following tables.

表 4 实验期间各组鹌鹑右足踝关节肿胀度 (% ,  $n = 12$ )

Table 4 Effects of high-protein and high-calcium diet on right ankle joint swelling in the quails

组别 Groups	10 天 10 d	20 天 20 d	30 天 30 d	40 天 40 d	50 天 50 d
对照组 Control group	2.00±1.45	3.15±1.98	2.57±1.81	3.81±2.84	3.66±2.47
模型 I 组 Model group I	2.20±2.23	3.05±2.80	4.58±3.69	6.80±4.77	3.56±2.32
模型 II 组 Model group II	4.4±2.92*	6.51±3.04**	11.08±6.32**	9.34±4.33**	10.45±3.87**

表 5 高蛋白高钙日粮对鹌鹑血清尿酸水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n = 12$ )

Table 5 Effects of high-protein and high-calcium diet on serum uric acid of the quails

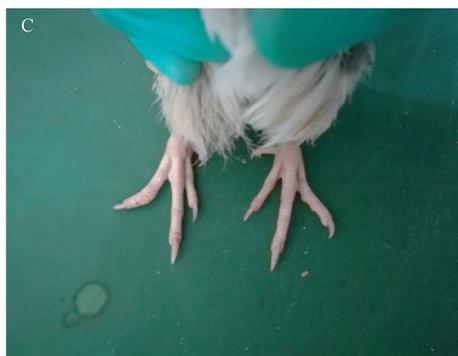
组别 Groups	0 天 0 d	10 天 10 d	20 天 20 d	30 天 30 d	40 天 40 d	50 天 50 d
对照组 Control group	237.17±61.58	247.69±92.39	237.77±89.69	215.92±59.14	210.67±71.56	223.71±80.03
模型 I 组 Model group I	245.11±83.65	319.73±96.11	322.25±69.36*	352.04±89.43**	336.91±81.58**	364.74±133.78**
模型 II 组 Model group II	245.06±43.15	366.79±81.36**	423.15±180.9**	451.52±201.5**	408.27±193.68**	654.29±207.73**



对照组鹌鹑正常足部形态  
The normal shape of feet of a quail in the control group



对照组鹌鹑正常踝形态  
The normal shape of the ankle in a quail in the control group



模型 II 组鹌鹑变形足部形态  
The deformed shape of feet of a quail in the model group II



模型 II 组鹌鹑变形踝形态  
The deformed ankle of a quail in the model group II



模型 II 组鹌鹑变形踝形态  
The deformed shape of ankle of a quail in the model group II



模型 II 组鹌鹑变形踝形态  
The deformed ankle of a quail in the model group II

图 1 鹌鹑正常足踝和变形足踝形态

Figure 1 Normal and deformed shapes of the of quail feet (ankles)

表 6 高蛋白高钙日粮鹌鹑粪尿酸水平 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n = 12$ )

Table 6 Effects of high-protein and high-calcium diet on fecal uric acid levels of the quails at 20 d

组别 Groups	20 天 20 d	40 天 40 d
对照组 Control group	33281.32±6344.93	18412.57±4528.81
模型 I 组 Model group I	24443.98±11095.04 *	16726.30±4641.35
模型 II 组 Model group II	16730.43±11415.54 **	14102.99±4388.33 *

注:与同期对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group of the same at the same day, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

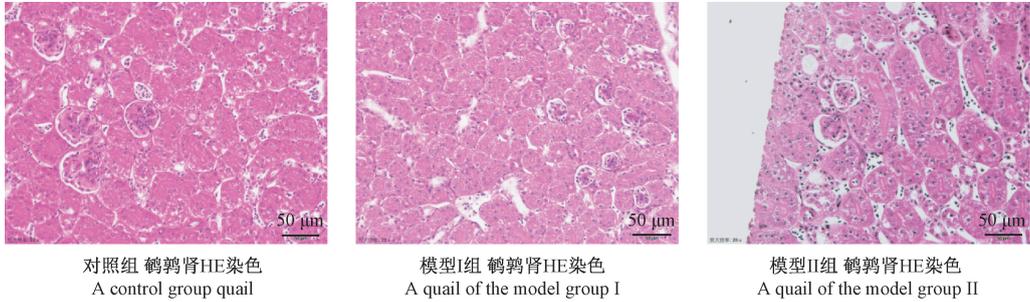


图 2 鹌鹑肾 HE 染色病理切片 ( $\times 400$ )

Figure 2 Histological changes of the quail renal tissues (HE staining)

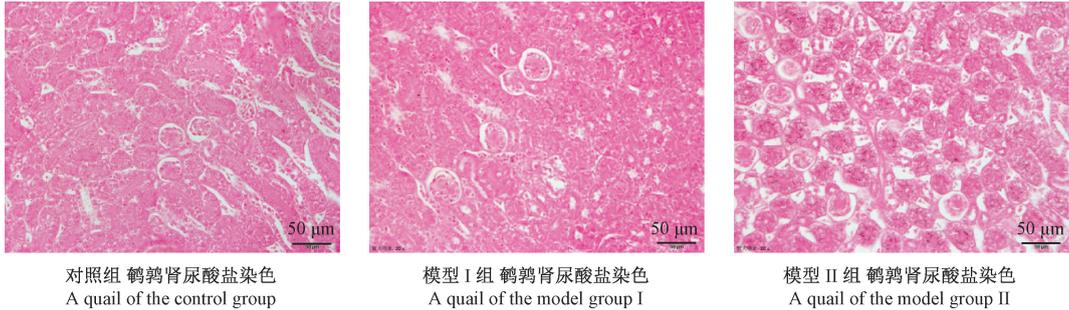


图 3 鹌鹑肾尿酸盐染色病理切片 ( $\times 400$ )

Figure 3 Pathological changes of the quail renal tissues (Urate staining)

表 7 高蛋白高钙日粮对 50 d 鹌鹑血清炎症因子表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL,  $n = 12$ )

Table 7 Effects of high-protein and high-calcium diet on the expression of serum inflammatory factors of the quails at 50 d

组别 Groups	白介素-1 $\beta$ IL-1 $\beta$	肿瘤坏死因子- $\alpha$ TNF- $\alpha$
对照组 Control group	72.55 $\pm$ 15.15	59.33 $\pm$ 10.85
模型 I 组 Model group I	81.96 $\pm$ 14.45	67.17 $\pm$ 13.05
模型 II 组 Model group II	88.86 $\pm$ 11.36*	71.95 $\pm$ 9.51*

## 2.4 鹌鹑血清炎症因子表达情况

由表 7 可见, 实验第 50 天模型 II 组鹌鹑血清炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著性高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 模型 I 组鹌鹑血清 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平与对照组无显著差异。

## 2.5 造模期间鹌鹑血清肌酐、尿素氮水平

由表 8 和表 9 可见, 与对照组相比, 模型 I 组血清尿素氮水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。模型 II 组

表 8 高蛋白高钙日粮对鹌鹑血清尿素氮水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{mol/L}$ ,  $n = 12$ )

Table 8 Effects of high-protein and high-calcium diet on serum urea nitrogen levels of the quails

组别 Groups	10 天 10 d	20 天 20 d	30 天 30 d	40 天 40 d	50 天 50 d
对照组 Control group	0.33 $\pm$ 0.43	1.57 $\pm$ 0.48	1.05 $\pm$ 0.51	1.67 $\pm$ 0.87	1.25 $\pm$ 0.32
模型 I 组 Model group I	1.07 $\pm$ 0.36	1.87 $\pm$ 0.63	0.43 $\pm$ 0.63	2.06 $\pm$ 0.87	1.31 $\pm$ 0.64
模型 II 组 Model group II	1.50 $\pm$ 0.42	2.15 $\pm$ 1.09	1.70 $\pm$ 0.82*	2.77 $\pm$ 1.03*	1.83 $\pm$ 0.87

表 9 高蛋白高钙日粮对鹌鹑血清肌酐水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{mol/L}$ ,  $n = 12$ )

Table 9 Effects of high-protein and high-calcium diet on serum creatinine levels of the quails

组别 Groups	10 天 10 d	20 天 20 d	30 天 30 d	40 天 40 d	50 天 50 d
对照组 Control group	99.93 $\pm$ 19.94	86.89 $\pm$ 26.82	95.29 $\pm$ 11.49	71.51 $\pm$ 11.95	86.67 $\pm$ 17.39
模型 I 组 Model group I	97.68 $\pm$ 17.5	86.89 $\pm$ 19.14	96.70 $\pm$ 14.92	74.73 $\pm$ 31.57	88.85 $\pm$ 25.98
模型 II 组 Model group II	95.17 $\pm$ 21.47	92.79 $\pm$ 19.06	98.16 $\pm$ 11.41	87.23 $\pm$ 20.02*	107.81 $\pm$ 16.38*

鹌鹑于实验第 30 天、40 天,血清尿素氮水平显著性高于对照组( $P < 0.05$ )。

实验期间,与对照组相比,模型 I 组血清肌酐水平无显著性差异( $P > 0.05$ );模型 II 组鹌鹑于实验第 40 天、50 天血清肌酐水平显著性高于对照组( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 高蛋白高钙摄食合并限制饮水诱导鹌鹑痛风的影响

实验研究表明实验期间对照组鹌鹑体重、日均采食量平稳上涨,一般状态良好。对鹌鹑肾组织切片进行尿酸盐染色(六胺银法),阳性反应时尿酸盐结晶被染成黑色,底色为粉红色。由图 3 可见,对照组鹌鹑肾组织未见黑色尿酸盐沉积。

模型 I 组以高蛋白高钙日粮结合自由饮水干预鹌鹑。该组鹌鹑一般状态与对照组无明显差异,未见明显痛风症状。血清尿酸水平显著升高,同时粪尿酸水平显著降低。该组鹌鹑肾组织可见少量尿酸盐沉积于肾小管周围。因为鹌鹑肝缺少精氨酸酶,蛋白质只能通过嘌呤核苷酸循环生成嘌呤,而在黄嘌呤氧化酶的作用下以尿酸作为代谢终产物排出体外<sup>[9]</sup>。以酵母浸膏作为高蛋白食饵饲喂鹌鹑,为尿酸的合成提供的更多的原料,引发鹌鹑高尿酸血症。鹌鹑具有特殊的生理结构,消化管、输尿管和生殖管末端汇合于泄殖腔,故鹌鹑粪尿排泄物中尿酸含量可反映鹌鹑排泄尿酸的能力,由于在血尿酸水升高同时粪尿酸水平降低,认为高蛋白高钙日粮对尿酸的排泄有抑制作用。肾是鹌鹑排泄尿酸的唯一通道,肾脏结构功能的改变直接影响尿酸排泄,长期处在高钙环境下会引起肾小球肿大、数量减少、肾小管急性细胞损伤等<sup>[10-11]</sup>,因此认为高钙日粮的添加可能通过造成鹌鹑肾损伤进而抑制尿酸排泄。因此在实验期间内,鹌鹑摄食蛋白质含量为 29.5%,钙含量为 7.8%的高蛋白高钙日粮,可增加鹌鹑尿酸生成、减少排泄,导致鹌鹑高尿酸血症并有少量尿酸盐沉积于肾,未见明显痛风症状。

模型 II 组鹌鹑摄食高蛋白高钙日粮结合限制饮水。鹌鹑体重、日均采食量平稳上涨,踝关节肿胀明显,部分鹌鹑出现懒动喜卧、跛足、足趾变型等痛风症状。限制饮水后,其血清尿酸水平极显著高于对照组,同时粪尿酸水平降低。炎症因子白介

素-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子 $\alpha$  显著升高。病理切片染色后可见肾小管周围密布黑色尿酸盐沉积,沉积现象较严重。结合血清肌酐、尿素氮结果推测高蛋白高钙日粮结合限制饮水能导致鹌鹑肾损伤,这可能与肾小管大量尿酸盐沉积相关。以上结果表明该方法可诱导鹌鹑痛风。尿酸难溶于水而易于与血液中钙、钠离子结合形成尿酸盐,尿酸盐具有胶体性质在血液中受大量血浆蛋白保护而保持稳定性,但当血液中尿酸水平和钙离子水平过高时,产生大量尿酸盐使尿酸盐溶液的稳定性遭到破坏而发生沉积<sup>[12]</sup>。饮水量多少与高尿酸血症及痛风的发生率成反比,饮水量增加、尿量增加,有利于尿酸的排泄从而维持血尿酸浓度稳定。在机体相对缺水状态下,血液浓缩,会加剧血尿酸浓度升高;尿液浓缩,粪尿排泄量减少,抑制尿酸排泄加剧鹌鹑血尿酸水平的升高;当给鹌鹑摄入相同高蛋白高钙日粮时,限制饮水后能使鹌鹑血尿酸、血钙浓度更高,容易聚集在器官、关节等部位形成沉积,诱发痛风发作<sup>[13-14]</sup>。实验结果表明,与单纯给予高蛋白高钙日粮的鹌鹑相比,限制饮水之后能使鹌鹑血尿酸水平更高、粪尿酸水平更低、肾脏尿酸盐沉积更显著,证实限制饮水量之后对鹌鹑尿酸排泄抑制作用更明显,促进尿酸盐沉积作用更显著,可见足够的饮水量有助于减缓尿酸盐沉积,减少痛风的发生。匡红艳等<sup>[15]</sup>对鸡饲喂高钙日粮、高蛋白日粮、高蛋白高钙日粮并限制饮水 7 周,而后改为正常自由饮水,通过对比同一组鸡限制饮水前后病理改变也证实限制饮水能导致血尿酸水平升高更显著,与本实验结果相一致。

作者前期通过给鹌鹑饲喂含有一定比例酵母浸膏粉和石粉的高蛋白高钙日粮拟诱导鹌鹑痛风<sup>[16]</sup>,但实验结果表明该方法对鹌鹑状态影响较大,导致鹌鹑一般状态差甚或死亡的现象,且造模不稳定,仅有部分鹌鹑出现关节肿大等症状。而本实验所造模型较稳定,从踝关节周径可知模型 II 组鹌鹑踝关节肿大,从血尿酸水平及肾脏尿酸盐沉积可知模型 II 组血尿酸升高更显著、尿酸盐沉积程度更明显。因此,当给予鹌鹑高蛋白高钙日粮并同时限制饮水时可诱发鹌鹑痛风。

#### 3.2 鹌鹑痛风模型研究的思考

痛风是长期嘌呤代谢障碍、血尿酸增高引起组织损伤的一组异质性疾。随着社会经济的发展

和人民生活水平的提高,国民饮食中蛋白质、嘌呤含量的增加,高尿酸血症和痛风的发病率呈上升趋势,且呈年轻化趋势,与多种疾病相关,其发病机理及治疗方法的研究成为人们的关注点。建立理想的痛风动物模型是痛风病的病理机制与药物筛选研究的基础,国内外学者对此进行了长期的研究,目前已有多种用于研究痛风的动物模型,但至今尚无符合人类痛风发病特点、能反应其病理过程的动物模型,虽然有些灵长类与人类代谢过程十分接近,但在实际情况下,由于条件限制,很难在大规模实验研究中使用。禽类动物痛风与人类痛风具有高度的相似性,若以禽类作为模型动物研究建立禽痛风模型,对人类尿酸盐沉积造成的病理损伤、痛风的发病机制及治疗药物筛选研究具有重要意义。

以高蛋白高钙日粮塑造的鹌鹑痛风实验模型与人类痛风具有较高的相似性:①发病原因的相似性。禽类动物痛风与人类痛风均由尿酸生成增多或尿酸排泄减少导致尿酸盐沉积而引起<sup>[17]</sup>。均受遗传、饮食、环境等因素影响,当富含蛋白质、嘌呤等食物摄入过多可引起尿酸生成增多进而易以钠盐、钙盐等形式沉积,形成痛风。②临床表现上的相似性。在临床表现上,尤其是禽类关节型痛风与人类痛风极为相似,均表现为关节肿胀,且疼痛肿胀多发生于末梢关节,如足趾关节、趾前关节,也可侵害腕关节、腕前关节等处。③病理基础的相似性。禽类与人类均缺少尿酸酶,无法像大多数哺乳动物那样将嘌呤代谢为可溶性尿素排出体外,均以尿酸为代谢终产物,尿酸难溶于水而易于以尿酸盐的形式沉积形成痛风。并且禽痛风是一种常见禽病,有较高的发病率和死亡率,因此本实验欲参照禽痛风的发病规律建立有效、简便、稳定、经济的禽痛风模型。

鹌鹑具有体型较小、易于操作,节省空间、适合大规模饲养,价格低廉等优势。本实验通过模拟临床高蛋白高钙饮食,合并限制饮水,成功诱导出鹌鹑痛风,证明该方法塑造鹌鹑痛风动物模型。但目前实验塑造的鹌鹑痛风模型尚不稳定,仍需要在操作方法、造模剂种类及剂量的筛选上进一步研究。其次鹌鹑尚未建立微生物控制标准及分级,这在一定程度上阻碍了禽类模型的应用<sup>[16]</sup>。因此对鹌鹑

痛风模型的塑造还需要进一步研究。

致谢 衷心感谢导师张冰教授和指导组林志健老师对我的研究思路、实验操作以及论文撰写给予的指导和帮助!衷心感谢本课题组李高玺、王雨、白云飞、李凡等同门们在实验方面给予我的帮助!感谢父母家人对我的关心、支持和理解!

参考文献:

- [ 1 ] 沈桂芹,于世家.尿酸排泄不良型高尿酸血症动物模型的建立[J].中国比较医学杂志,2017,27(08):55-59.
- [ 2 ] 陈道有,何长军.鸡痛风病的调查报告[J].饲料博览,2017(06):46.
- [ 3 ] 宋华英,赵克强,靳会珍.蛋鸡生产中的营养代谢病[J].中国畜牧兽医文摘,2015,31(08):209.
- [ 4 ] 黄志浩,孙宝,方梅等.鹰尿酸盐沉积综合征的诊断及病理学观察[J].中国兽医学报,2016,36(06):1019-1023.
- [ 5 ] 李有龙,徐麟木,唐杨春等.不同蛋白质水平饲料对蓝孔雀痛风发病率的影响[J].上海畜牧兽医通讯,2015(01):32-33.
- [ 6 ] 黎晓敏,邓茂先,李前勇等.鸡实验性尿酸盐沉积症的肾脏病理学研究[J].中国兽医学报,1998(04):76-78.
- [ 7 ] 杨玲玲,黄丽贞,邓家刚.痛风性关节炎动物模型研究进展[J].世界中医药,2015,10(09):1461-1463+1467.
- [ 8 ] NRC. Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition [S]. Washington, D.C.: National Academy Press, 1994.
- [ 9 ] 雷鹏,郭小权,曹华斌等.禽痛风的研究进展[J].中国家禽,2011,33(02):48-51.
- [ 10 ] 郭小权,黄克和,骆建兵等.高钙高蛋白日粮对青年蛋鸡体液酸碱度和电解质的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,(10):80-84.
- [ 11 ] 骆建兵.高钙高蛋白日粮对鸡肝肾功能与酸碱平衡的影响及痛风形成机理研究[D].南京:南京农业大学,2006.
- [ 12 ] 凌明亮.禽痛风的发病机制及其防治方法[J].湖北畜牧兽医,2005(02):26-29.
- [ 13 ] 李复兴.饮水与高尿酸血症[J].中国食品,2016,691(3):36-36.
- [ 14 ] 林志健,李凡,张冰.禽类动物高尿酸血症的研究进展[J].中国实验动物学报,2017,25(05):572-576.
- [ 15 ] 匡红艳,程太平,胡建兵,曹政,寇文娥,荣俊.鸡持续高尿酸血症模型的制备方法研究[J].四川动物,2008(04):554-558.
- [ 16 ] 王海鸽,张冰,林志健,李高玺,曲聪聪.高蛋白高钙日粮对鹌鹑尿酸代谢及痛风发生的影响[J].中国家禽,2018,40(19):22-27.
- [ 17 ] 房于明.家禽营养[M].北京:中国农业大学出版社,2004.

[收稿日期]2018-08-08